

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
УО «ВИТЕБСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ОРДЕНА ДРУЖБЫ НАРОДОВ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ДОСТИЖЕНИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ, КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ И ФАРМАЦИИ

Материалы 67-ой научной сессии сотрудников университета

2-3 февраля 2012 года

УДК 616+615.1+378
ББК 5Я431-52.82я431
Д 70

Редактор:

Профессор, доктор медицинских наук В.П. Дейкало

Заместитель редактора:

доцент, кандидат медицинских наук С.А. Сушков

Редакционный совет:

Профессор В.Я. Бекиш, д.ф.н. Г.Н. Бузук, профессор В.С. Глушанко, профессор С.Н. Занько, профессор В.И. Козловский, профессор Н.Ю. Коневалова, д.п.н. З.С. Кунцевич, профессор Н.Г. Луд, д.м.н. Л.М. Немцов, профессор М.А. Никольский, профессор В.И. Новикова, профессор В.П. Подпалов, профессор М.Г. Сачек, профессор В.М. Семенов, профессор А.Н. Щупакова, доцент Ю.В. Алексеенко, доцент С.А. Кабанова, доцент Л.Е. Криштопов, доцент С.П. Кулик, доцент П.С. Васильков, доцент И.А. Флоряну.

Д 70 Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации. Материалы 67-й научной сессии сотрудников университета. – Витебск: ВГМУ, 2012. – 521 с.

ISBN 978-985-466-518-4

Представленные в рецензируемом сборнике материалы посвящены проблемам биологии, медицины, фармации, организации здравоохранения, а также вопросам социально-гуманитарных наук, физической культуры и высшей школы. Включены статьи ведущих и молодых ученых ВГМУ и специалистов практического здравоохранения.

УДК 616+615.1+378
ББК 5Я431+52.82я431

© УО «Витебский государственный
медицинский университет», 2012

ISBN 978-985-466-518-4

СПОСОБ ФОРМИРОВАНИЯ МИКРОБНЫХ БИОПЛЕНОК

Окулич В.К., Кабанова А.А., Плотников Ф.В., Булавкин В.П.

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

Актуальность. В настоящее время общепризнано, что основной формой существования бактерий в естественных условиях являются связанные с поверхностью сообщества, получившие название биопленок, а не отдельные планктонные клетки. Кооперация бактерий приводит к формированию различных типов микробных сообществ, общим свойством которых является их относительная изолированность от внешней среды [1]. Бактерии, находящиеся в составе микробных сообществ, в частности биопленок, становятся менее доступными для действия различных внешних факторов – антибиотиков, антисептиков, факторов защиты макроорганизма [2]. На пути к бактериям у антимикробных препаратов находятся поверхностные пленки и межклеточный матрикс, отграничивающие клетки сообщества от внешней среды. В результате бактерии внутри сообществ, не изменяя своей индивидуальной чувствительности, лучше выживают в присутствии антибактериальных препаратов из разных групп.

На сегодняшний день предполагается, что 90% изученных видов таксономического домена *Bacteria* способны в различной степени интенсивности формировать биопленки [3]. Таким образом, явление образования сложных консорциумов прокариотами универсально в природе. Роль биопленок в инфекционной патологии была оценена практически сразу же после их обнаружения. С конца прошлого столетия в медицине в многочисленных исследованиях стали появляться сообщения о способности бактерий образовывать пленчатые макроструктуры на поверхностях различных медицинских имплантатов и катетеров. Формирование биопленок в очаге воспаления ведет к хронизации инфекционного процесса и сопровождается неудовлетворительными результатами антибиотикотерапии. Несмотря на очевидную актуальность для практической медицины, свойства биопленок остаются недостаточно изученными, не разработано простого и доступного для клинического применения метода, позволяющего формировать и исследовать биопленки *in vitro* [3].

Цель исследования – разработка простого, наименее затратного и доступного для клинического применения способа оценки образования микроорганизмами биопленки, не требующего длительных временных затрат.

Материал и методы. Для разработки метода образования биопленок использовали клинический изолят *Pseudomonas aeruginosa* №539/2011 полученный из микробиологической лаборатории Республиканского научно-практического центра «Инфекция в хирургии».

Результаты и обсуждение. В ходе проведения экспериментального исследования разработан метод получения биопленки *in vitro*. Способ осуществляется

следующим образом. Штамм бактерий выращивают на агаре при 37°C в течение 24 часов. В асептических условиях с помощью бактериологической петли готовят взвесь микроорганизмов в бульоне Мюллера-Хинтона с оптической плотностью на денситометре 0,5 единиц оптической плотности, что соответствует конечной концентрации $1,5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. В лунки планшета вносят по 150 мкл полученной взвеси бактерий, на один штамм отводят 8 лунок. Отрицательным контролем служат лунки с 150 мкл бульона Мюллера-Хинтона без бактерий. Планшет инкубируют в термостате при температуре 37°C в течение 24 часов. Из лунок с помощью стерильной пипетки удаляют содержимое. Лунки промывают четырехкратно дистиллированной водой с помощью, например, автоматической мойки МВ-350 производства «Технофорум». Биопленку фиксируют путем добавления в лунки по 160 мкл 2,5 % раствора глутаральдегида и его инкубации в течение 5 минут. Планшет четырехкратно промывают и вносят по 170 мкл 0,25% раствора кристаллического фиолетового на 5 минут, после чего снова повторяют процедуру отмывки четыре раза и высушивают в течение 10 минут. В лунки добавляют по 200 мкл 33% раствора уксусной кислоты и инкубируют при комнатной температуре 10 минут до полной экстракции кристаллического фиолетового в кислоту. Для измерения планшет помещают в многоканальный спектрофотометр Ф300, где при длине волны 620 нм определяют оптическую плотность в лунках. По полученным данным определяют среднее значение восьми лунок и оценивают способность образования микроорганизмом биопленки *in vitro*. При значении оптической плотности до 0,12 оптических единиц определяют отсутствие способности образовывать биопленки, при 0,12-0,24 – среднюю, при более 0,24 – сильную способность к образованию биопленки. Приведенные значения определены статистически с помощью функции частотного анализа в пакете программ «Statistica 7.0».

Выводы.

Разработанный метод может быть использован в бактериологических лабораториях с целью количественной оценки эффективности образования биопленки различными микроорганизмами, что в дальнейшем позволит корректировать антимикробную терапию с учетом способности бактерии к образованию биопленок. Предложенный метод позволит более тщательно изучить свойства микробных сообществ и расширяет возможности дальнейшего изучения воздействия антибактериальных препаратов на биопленки.

Литература:

1. Bjarnsholt, T. Interference of *Pseudomonas aeruginosa* signalling and biofilm formation for infection

control / T. Bjarnsholt [et al.] // Expert Rev. Mol. Med. – 2010. – №12. – P. 121–126.

2. Cassat, J. Transcriptional profiling of a *Staphylococcus aureus* clinical isolate and its isogenic agr and sarA mutants reveals global differences in comparison

to the laboratory strain RN6390 / J. Cassat [et al.] // Microbiology. – 2006. – №152. – P. 3075–3090.

3. Hall-Stoodley, L. Evolving concepts in biofilm infections / L. Hall-Stoodley, P. Stoodley // Cell Microbiol. – 2009. – Vol. 11, №7. – P. 1034–1043.

ГЕНОТОКСИЧЕСКИЙ И ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТЫ ПРИ КОМБИНИРОВАННОМ ЛЕЧЕНИИ ИНВАЗИИ ТРИХИНЕЛЛАМИ У ЧЕЛОВЕКА

Пашинская Е.С., Бекиш В.Я., Бекиш Л.Э., Зорина В.В.

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

Актуальность. Трихинеллез человека – особо опасное зоонозное заболевание, вызываемое нематодой *Trichinella spiralis*, в жизненном цикле которой выделяют кишечную, миграционную и мышечную фазы инвазии. Частота встречаемости заболевания в Беларуси в течение 2000–2010 гг. колебалась от 0,38 до 0,78 случаев на 100 тыс. населения. При разработке принципов лечения трихинеллеза, направленных на защиту генома хозяина от роста хромосомных поломок, было показано, что целесообразно назначать мебендазол с индометацином и витаминным антиоксидантным комплексом с селеном [3].

Целью исследования было изучение первичных повреждений ДНК, числа апоптотических клеток при комбинированном лечении трихинеллеза человека, включающем специфическую (мебендазол или альбендазол), патогенетическую (ибупрофен) и антиоксидантную (витамины С, Е, β-каротин с Se) терапии. Выбор витаминного антиоксидантного комплекса определялся наличием в нем, кроме витаминов-антиоксидантов, селена, который в форме Se-цистеина является структурным компонентом ряда Se-протеинов, входящих в ферментативное звено антиоксидантной защиты.

Материал и методы. Исследования проводились на базе Витебской и Гомельской областных инфекционных больниц с 2008 по 2011 год. Под наблюдение находились 31 больной со средней тяжестью трихинеллеза (17 мужчин и 14 женщин) в возрасте от 20 до 68 лет. Основную группу составляли 25 больных в возрасте 19–40 лет (80,65 %), 6 человек – в возрасте 41 и 68 лет (19,35 %).

Больные были разделены на четыре группы. Первая группа (8 человек) получала монотерапию мебендазолом (доза 300 мг в сутки в три приема – 14 дней), вторая (7 человек) – монотерапию альбендазолом (800 мг в сутки – 14 дней), третья (8 человек) – комбинированную терапию мебендазолом (доза 300 мг в сутки в три приема – 7 дней) в сочетании с ибупрофеном (по 1 таблетке 4 раза в день – 5 дней) и витаминным антиоксидантным комплексом с Se (по 1 капсуле два раза в день – 7 дней); четвертая (8 человек) – комбинированную терапию альбендазолом

(доза 400 мг 2 раза в сутки – 7 дней) в сочетании с ибупрофеном (по 1 таблетке 4 раза в день – 5 дней) и витаминным антиоксидантным комплексом с Se (по 1 капсуле два раза в день – 7 дней). У всех больных до и после окончания лечения (через 14 дней) изучали методом щелочного гель-электрофореза изолированных клеток уровни щелочно-лабильных сайтов, одноцепочечных разрывов ДНК лимфоцитов периферической крови и апоптотических клеток. В качестве негативного контроля при проведении метода ДНК-комет были использованы данные лимфоцитов 15 доноров. Результаты обрабатывались статистически с использованием программы Excel 2007.

Результаты и обсуждение. “Длина хвостов комет” лимфоцитов периферической крови больных трихинеллезом до лечения была достоверно выше контрольного уровня в 7,6 раз. Процент ДНК в “хвостах комет” (9,84 %) был выше в 75,7 раз, по сравнению с негативным контролем. “Момент хвоста” превысил в 21 раз показатель контроля. Процент апоптотических клеток крови был выше в 38,8 раза по сравнению с донорами крови.

После лечения мебендазолом “длина хвостов комет” лимфоцитов больных трихинеллезом была ниже в 1,7 раза данных до лечения, но в 4,4 раза превышала показатель негативного контроля. Процент ДНК в “хвостах комет” у больных трихинеллезом в 52,2 раза превысил контрольный уровень и в 1,5 раза был ниже по сравнению с данными до лечения. “Момент хвоста” лимфоцитов был выше контрольного уровня в 13,4 раз, а также был меньше в 1,6 раза, чем до лечения. Процент апоптотических клеток был ниже в 1,9 раза по отношению к данным, полученным до лечения, и в 20,7 раза превышал показатель доноров крови.

После лечения альбендазолом “длина хвостов комет” превысила показатель негативного контроля в 5,2 раз и в 1,5 раза была меньше, чем до лечения. Процент ДНК в “хвостах комет” превысил контрольный показатель в 41,7 раз и достоверно был меньше в 1,8 раза по сравнению с данными, полученными до лечения. “Момент хвоста” лимфоцитов больных трихинеллезом превысил показатель контроля в 12,3 раза и достоверно был меньше в 1,7 раза по отношению к